

ヒト胸腺細胞からのLAK活性の誘導

著者	蝦名 宣男
号	1895
発行年	1987
URL	http://hdl.handle.net/10097/20038

氏 名（本籍）	えび 蝦	な 名	のぶ 宣	お 男
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1 8 9 5	号
学位授与年月日	昭 和	6 2	年	2 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭和 5 5 年 3 月 東北大学医学部医学科卒業			
学 位 論 文 題 目	ヒト胸腺細胞からの L A K 活性の誘導			

（主 査）

論文審査委員 教授 佐 藤 寿 雄 教授 今 野 多 助

教授 橘 武 彦

論文内容要旨

目 的

レコンビナントインターロイキン2 (rIL2) 存在下にヒト末梢血リンパ球を *in vitro* で培養することにより, NK細胞に非感受性の細胞に対する細胞障害活性(LAK活性)が誘導されることが発見され, rIL2 そのもの, あるいは末梢血リンパ球を rIL2 で培養してLAK活性を誘導した細胞(LAK細胞)を生体内へ戻してやる養子免疫療法による抗腫瘍効果に期待が持たれている現在, LAK誘導機構の解明は, より効果的に rIL2 を利用するうえで重要な意味を持っている。ヒト末梢血リンパ球の場合LAK細胞はNK細胞を前駆細胞として誘導されること, 誘導の過程でガンマ型インターフェロン(IFN γ)が産生され, このIFN γ が必須の役割を果たしていることが判明している。しかし, NK細胞が含まれずTリンパ球が主体を占める, 腫瘍の周囲に浸潤したリンパ球(TIL)からもLAK活性が誘導されることが明らかになり, さらに, マウスの実験系ではTILから誘導したLAK細胞による養子免疫療法は, 末梢リンパ球からのものよりはるかに効果的であることが報告された。そこでTリンパ球からのLAK活性の誘導の1つの指標とする目的で, ヒト胸腺細胞を用いてLAK活性を誘導して解析を加えた。

方 法

免疫異常や白血病, リンパ腫以外の疾患により死亡し, 死後1時間以内に病理解剖のなされた15才以下の剖検例から胸腺と心室内血液を採取し, 胸腺は細片化した後ステンレスメッシュを通過させて細胞浮遊液とした。血液からは血清を分離し, 非働化して自己血清として用いた。胸腺細胞はピーナツアグルチニン(PNA)凝集性(PNA⁺)細胞と非凝集性(PNA⁻)細胞とに分離し, 非分画の細胞とともにLAK活性誘導について比較検討した。また, Percoll 不連続密度勾配法で比重1.085 から1.060 まで0.005 間隔で分離した各比重の胸腺細胞についてもLAK誘導を比較検討した。細胞は 5×10^6 cells/mlに調整し, 10%自己血清加RPMI 1640培地にて培養した。ヒト rIL2 はシオノギ製薬のS6820を用いた。LAK活性誘導の際, 同時に³H-チミジンの取り込みにより細胞増殖反応を測定し, 上清はそのIFN活性を測定することによりIFN産生の指標とした。IFNの型の同定は, 検体をモノクローナル抗IFN γ 抗体と4℃のもとに30分間反応させ, そのIFN活性を測定することにより行なった。LAK活性の測定は, 4時間の⁵¹Cr release assay により行なった。次式により%細胞障害活性を求めた。

$$\%細胞障害活性 = \frac{\text{検体遊離 (cpm)} - \text{自然遊離 (cpm)}}{\text{最大遊離 (cpm)} - \text{自然遊離 (cpm)}} \times 100$$

この際、最大遊離は標的細胞を 0.1 N NaOH 中で培養したものの、自然遊離は 10% FCS 加 RPMI 1640 中で培養したものの上清から得たものである。標的細胞としては、NK 感受性の K562 の他に NK 非感受性の WISH, Raji, Ball-1, Molt-4, THP-1, U-937, 脾癌の樹立細胞株である PK-1 (当教室小針博士より分与), 食道癌の樹立細胞株である TE-9 (東北大学第 2 外科赤石博士より恵与) を使用した。胸腺細胞および LAK 細胞の表面マーカーについて、FITC 標識 PNA を用いた直接蛍光抗体法により、あるいは OKT 3, OKT 4, OKT 8, Leu 7, Leu 11, 抗 Tac 抗体, および FITC 標識ヤギ抗マウス Ig 抗体を用いた間接蛍光抗体法により解析した。また、上記モノクローナル抗体と補体とを用いた negative selection による LAK 活性の変動についても検討した。

結 果 お よ び 考 察

rIL2 による胸腺細胞の増殖反応と細胞障害活性の誘導および IFN の産生は、おもに PNA⁻ 細胞に認められ、PNA⁺ 細胞では殆ど認められなかった。PNA⁻ 細胞からの細胞障害活性の誘導では、K562 に対しては、rIL2 10 U/ml 以上で強く誘導されたが、WISH に対しては 100 U/ml 以上を必要とし、いずれの細胞に対しても 1000 U/ml でピークに達した。これにより、以下の実験では suboptimal dose である rIL2 200 U/ml の用量を用いた。増殖反応、細胞障害活性の誘導、IFN の産生は、いずれも培養 3 日目では認められず、培養 5 日目以降に出現した。末梢血リンパ球からの LAK 活性は培養 3 日目で誘導されることが知られており、胸腺細胞からはこれより遅く誘導されることが明らかになった。産生される IFN はガンマ型であることが同定され、LAK 誘導系にモノクローナル抗 IFN γ 抗体を加えると LAK 活性は誘導されず、この産生される IFN γ が必須の役割を果していることが証明された。胸腺細胞から誘導された細胞は、調べた範囲で全ての細胞に細胞障害活性を有していた。Percoll を用いて胸腺細胞を分離すると低比重分画に PNA⁻ 細胞が濃縮され、この分画から LAK 活性が誘導された。胸腺細胞からの LAK 誘導系には Leu 7⁺, Leu 11⁺ の NK 細胞は混在せず、NK 細胞は関与していなかった。一方、抗 OKT 4, OKT 8 抗体と補体とによる negative selection とで LAK 活性は低下せず、T cell マーカーの、より詳細な解析を必要とすることが明らかになった。

審 査 結 果 の 要 旨

リンフォカインのひとつであるインターロイキン2 (IL2) はヘルパーT細胞から産生され、その存在下にリンパ球を培養するとNK細胞に非感受性の腫瘍細胞に対しても細胞障害活性を有するLAK細胞 (lymphokine activated killer cells) が誘導されることから、その抗腫瘍効果に期待が持たれている。IL2 単独投与や、IL2を用いて末梢血リンパ球からLAK細胞を誘導してそれを生体内へ戻す養子免疫療法に関して、多くの試みがなされているが、LAK細胞誘導機構の解明もまたIL2を用いたこれらの治療法をより効果的に行なうために重要な意味を有することはいうまでもない。末梢血リンパ球からLAK細胞を誘導する場合、ガンマ型インターフェロン (IFN_γ) が産生され、この IFN_γ が必須の役割を果たすこと、また、LAK細胞誘導系にIL2の他にさらに IFN_γ を加えると、より強い活性を有するLAK細胞が誘導されることが知られている。また、末梢血リンパ球の場合のLAK細胞の前駆細胞はNK細胞であり、末梢血中のT細胞からはLAK細胞が誘導されないことも明らかになっているが腫瘍の周囲に浸潤したリンパ球 (TIL: Tumor infiltrating lymphocyte) にはNK細胞が殆んど存在せずT細胞が主体であるにもかかわらず、このTILからもLAK活性が誘導されることが判明している。

本論文は幼若化したT細胞がLAK細胞の前駆細胞となりうることを想定し、NK細胞からのLAK細胞誘導の場合との細胞学的な類似点および相違点について解析したものである。

材料として、ほぼ純粋なT細胞の集団であり、しかも幼若化したT細胞に類似した状態にあると思われる胸腺細胞に着目し、これを15才以下の剖検例から採取して用いた。培養にはRPMI 1640を用い、血清は生体内に近い条件を得るため自己血清を用いた。

第1に、胸腺細胞中には未成熟のピーナッツアグルチニン (PNA) 凝集性細胞と成熟したPNA非凝集性細胞とがあるが、LAK細胞の前駆細胞となるのはPNA非凝集性の成熟した胸腺細胞のみであることが明らかになった。これは、レクチンを用いず、Percoll 不連続密度勾配法によって比重により細胞を分離した場合も同様であった。第2に、胸腺細胞からLAK細胞を誘導する場合、IL2、100 u/ml以上と、NK細胞よりも高濃度のIL2を必要とすること、また、LAK活性は培養5日目以降とNK細胞より遅く誘導されてくることが明らかになった。第3に、胸腺細胞からのLAK細胞誘導系においてもNK細胞からの場合と同様、 IFN_γ が産生され、この IFN_γ が必須の役割を果たすとともに外因性に加えた IFN_γ によりさらに強いLAK活性が誘導されることを明らかにした。

本論文は、T細胞の材料として胸腺細胞を用い、細胞分離にPercollを用いるなど独創的なものであり、IL2を用いた癌治療に多くの示唆と学問的根拠を与えるすぐれた論文である。従って、本論文は学位論文として、学位を授与するに値するものと認める。